



MutaCHIP® TOXO

DNA-Makroarray Testkit für die Untersuchung von Genetischen Variationen im Zusammenhang mit Entgiftung und Arzneimittel-Nebenwirkungen





Nur für in-vitro Diagnostik

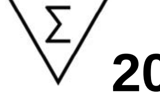




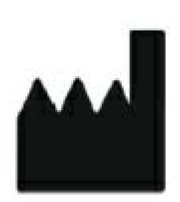
KF391011


10



KF390011


20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com
Tel.: +49 (0)6251/ 701900
Fax: +49 (0)6251/ 849430

Inhaltsverzeichnis

1 Verwendungszweck

Der MutaCHIP® TOXO Test ist ein molekularbiologischer Test zur Detektion von Mutationen in Genen, die den Körper vor Nebenwirkungen und Vergiftungen ausgelöst durch Medikamente oder körperfremde Stoffe schützen. Die untersuchten Genvarianten stehen im Zusammenhang mit dem Metabolismus von Xenobiotika und deren Transport aus der Körperzelle, dem Abbau oder Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies und der Wirksamkeit und den damit verbundenen Nebenwirkungen von Warfarin.
Für diesen Test wird genomische DNA mittels DNA-Makroarray Technologie untersucht. Folgende Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single-nucleotide polymorphisms, SNP) und Mutationen werden auf dem MutaCHIP® TOXO untersucht:

Eigenschaft	Gen	Variation	rsNummer
Phase I Biotransformation	CYP1A1	*2A (3798T>C)	rs4646903
	CYP1A2	*1C (-3860G>A)	rs2069514
		*1F (-163A>C)	rs762551
	CYP2C9	*2 (430C>T)	rs1799853
		*3 (1075A>C)	rs1057910
	CYP2C19	*2 (19154G>A)	rs4244285
		*3 (17948G>A)	rs4986893
		*17 (-806C>T)	Rs12248560
	CYP3A5	*2 (27289C>A)	rs28365083
		*3 (6986G>A)	rs776746
Phase II Biotransformation	GSTM1	14kb Deletion	
	GSTT1	50kb Deletion	
	GSTP1	A>G	Rs1695
	NAT2	481C>T	rs1799929
		590G>A	rs1799930
		857G>A	rs1799931
	COMT	G>A	rs4680
Transport von Xenobiotica aus der Körperzellen	MDR1	3435 C>T	rs1045642
Reaktiven Sauerstoffspezies	SOD2	C>T	rs4880
	CAT	-262C>T	Rs1001179
	CYBA	242C>T	rs4673
	NOS3	-786C>T	rs2070744
Wirksamkeit und Nebenwirkungen von Warfarin	VKORC1	*2 (-1639G>A)	rs9923231

2 Testprinzip

Zur Analyse der Mutationen werden die variablen Bereiche der unterschiedlichen Gene mittels PCR amplifiziert, wobei frisch extrahierte genomische DNA des Patienten als Matrize dient. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend auf den MutaCHIP gegeben und nach mitgeliefertem Protokoll bearbeitet. Die Analyse mittels Präzipitationsreaktion lässt eine eindeutige Genotypisierung aller auf den MutaCHIP gespotteten Allele der verschiedenen Gene zu.
Das amplifizierte Produkt wird auf den MutaCHIP gegeben und bindet an den dort immobilisierten Sonden. Durch einen Waschschritt werden unspezifisch gebundene Fragmente wieder entfernt. Im Anschluss wird das Enzym hinzugegeben, welches an den Sonden-Fragment-Komplex bindet. Nach Zugabe des Substrats tritt eine Fällungsreaktion an den Stellen, an denen noch DNA gebunden ist, auf. Das farbige Präzipitat wird mit dem Imagereader detektiert und von der dazugehörigen Software ausgelesen und bewertet.

3 Kitbestandteile

Jedes Testkit enthält die folgenden Reagenzien zur Durchführung von 20 MutaCHIP Assays, sowie eine Gebrauchsanweisung.

Bezeichnung	Gefäßgröße	Menge
PCR Mix A (grüner Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix B (gelber Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix C (roter Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix D (blaue Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix E (weißer Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
Polymerase	2 mL Schraubröhre mit Einsatz	1
Hybridisation Buffer	30 mL Plastikgefäß	1
Washing Buffer	60 mL Plastikgefäß	1
Conjugation Mix	4 mL Plastikgefäß	1
Substrate	30 mL Plastikgefäß (braun)	1
DNA Ref	2 mL Schraubgefäß	1
MutaCHIPs	1,5 mL Gefäß	20
Gebrauchsanweisung	/	1

4 Erforderliche Materialien

Benötigte Geräte - von PharmGenomics erhältlich:

- Macroarray Analysing Tool (MAAT):
  - Notebook + TOXO Genomics Software
  - MutaCHIP Imagereader
  - Thermocycler für PCR (Peqlab Primus 25 advanced)
  - Thermomixer mit Kühlfunktion (BIOR Mixing Block MB-102)

Benötigte Geräte und Verbrauchsmaterialien - nicht mitgeliefert:

- Pipetten:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 0.5 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0,2 ml PCR Gefäße (steril)

5 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Komponenten sind bei 2-8 °C zu lagern.
- Das Substrat ist unbedingt vor Lichteinwirkung zu schützen.
- Im Inneren des Beutels befinden sich 5x MutaCHIPs mit jeweils geöffnetem Deckel. Wenn ein Lichtschutzfolien-Beutel geöffnet wurde, müssen die Deckel der darin verbleibenden MutaCHIPs unbedingt geöffnet bleiben, da das Schutzgas entweicht.
- Die MutaCHIPs können im wieder lose (nicht luftdicht) verschlossenen (keine Klebestreifen verwenden!) Lichtschutzfolien-Beutel mehrere Wochen bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Dabei einen dunklen und trockenen (vor Feuchtigkeit schützen) Ort zur Aufbewahrung auswählen.
- Um selbst minimale Performanceverluste zu vermeiden, empfehlen wir jedoch den Verbrauch eines geöffneten MutaCHIP Beutels möglichst innerhalb von zwei Wochen!
- Die MutaCHIPs sind gegen direkte Sonneneinstrahlung und Staub zu schützen.

6 Arbeitsbedingungen

- Die MutaCHIPs dürfen niemals zentrifugiert werden.
- Die Oberfläche des MutaCHIPs darf nicht mit der Pipettenspitze berührt werden
- Der MutaCHIP darf nur mit den im Protokoll erwähnten Substanzen verwendet werden.

7 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.

- Der Test ist zur Verwendung mit **frisch** extrahierter genomischer DNA aus EDTA-Vollblut als Ausgangsmaterial geeignet. Nur dann können optimale Ergebnisse sichergestellt werden.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Lots.
- Die MutaCHIPs sind:
  - nur für den Einmalgebrauch bestimmt
  - nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden
- Der MutaCHIP darf während den Arbeitsschritten nicht austrocken!
- Der MutaCHIP ist für den Gebrauch mit dem MAAT und der dazugehörigen Software von PharmGenomics ausgelegt.
- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle Ausgangslösungen während des Arbeitens kühlen.
- Das MutaCHIP-Gefäß mit zwei Händen öffnen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Druck auf den MutaCHIP ausgeübt wird.

8 Probengewinnung

Als Matrize für die PCR Amplifikation dient genomische DNA aus EDTA-Vollblut. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 15-30 ng/µl liegen. Die Reinheit ($OD_{260/280}$) der DNA sollte höher als 1.8 sein.

Für den Assay darf nur hochmolekulare (frisch extrahierte) DNA verwendet werden.

9 Testdurchführung

9.1 PCR Produktherstellung

- Vor Beginn der Arbeiten sollte sichergestellt sein, dass die Arbeitsflächen und eingesetzten Geräte dekontaminiert sind
- Die Komponenten des Kits, die zur Durchführung der PCR benötigt werden, bereitstellen

Zur Amplifikation der Ziel-DNA werden fünf PCR-Ansätze pro Probe benötigt – für jeden Primer Mix einer! Diese werden wie in folgenden Tabellen beschrieben pipettiert.

PCR Mix A:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	4,0 µL
PCR Mix A (grüner Deckel)	20,8 µL
Polymerase	0,2 µL

PCR Mix B:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	4,0 µL
PCR Mix B (gelber Deckel)	20,8 µL
Polymerase	0,2 µL

PCR Mix C:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	4,0 µL
PCR Mix B (roter Deckel)	20,8 µL
Polymerase	0,2 µL

PCR Mix D:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	4,0 µL
PCR Mix B (blauer Deckel)	20,8 µL
Polymerase	0,2 µL

PCR Mix E:

Bestandteil	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz
DNA (min. 30 ng – max. 60 ng)	4,0 µL
PCR Mix B (weißer Deckel)	20,8 µL
Polymerase	0,2 µL

Die Proben in den Thermocycler stellen und das in 10.2 beschriebene PCR Protokoll verwenden.

9.2 Probenzusammenführung und Verdünnung

Das PCR-Protokoll muss für jedes Labor erneut etabliert werden, da die verschiedenen Thermocycler unterschiedliche Heizraten haben. Diese Etablierung entfällt, wenn der empfohlene Thermocycler verwendet wird (Peqlab Primus 25 advanced). Für die Etablierung kann mit dem folgenden Standard-Protokoll begonnen werden:

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2	1 x
Denaturierung	94	0,5	10 x
Primer Hybridisierung	72	0,5	
Elongation	72	1,5	
Denaturierung	94	0,5	25 x
Primer Hybridisierung	60	0,5	
Elongation	72	1,5	
Finale Elongation	72	5	1 x
Store at	8	8	

9.3 MutaChip Protokoll

A) Vorbereitung des Hybridisierungspuffers
Falls der Hybridisation Buffer trüb oder flockig geworden ist, kann dieser für wenige Sekunden in der Mikrowelle (240 W) oder in einem Wasserbad erwärmt und durch Schwenken homogenisiert werden, bis er wieder klar ist. Vor dem Verwenden muss der Puffer auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt werden.

B) Vorbereitung der DNA Proben

- Thermoshaker auf **51 °C** vorheizen.
- **5 µL** PCR-Produkt A, **5 µL** PCR-Produkt B, **5 µL** PCR-Produkt C, **5 µL** PCR-Produkt D und **5 µL** PCR-Produkt E in ein frisches PCR Reaktionsgefäß überführen und kurz vortexen.
- Die so vorbereitete Probe für **2 min.** bei **95 °C** denaturieren.
- Anschließend die denaturierte Probe mit **100 µL** Hybridisation Buffer auffüllen und durch auf- und abpipettieren mischen.
- Das Gemisch vollständig in den MutaCHIP überführen, ohne dabei den Boden des MutaCHIPs zu berühren.

C) Hybridisierung

- Hybridisieren der Probe bei **51°C**, **550rpm** für **30 min.**

D) Waschschritte nach der Hybridisierung
Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Hybridisation Buffer aus Schritt C) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPs bei **51 °C**, **550 rpm** für **5 min.**

E) Konjugationsschritt

Den Thermoshaker auf **21 °C** temperieren.

Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden! Der Washing Buffer muss auf dem MutaCHIP verbleiben bis die Zieltemperatur erreicht ist!

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Washing Buffer aus Schritt D) vollständig entfernen
- **100 µL** Conjugation Mix vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Konjugation des MutaCHIPs bei **21 °C**, **550 rpm** für **15 min.**

F) Zweiter Waschschritt

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Conjugation Mix aus Schritt E) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPs bei **21 °C**, **550 rpm** für **5 min.**

G) Färbung

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten! **Der Chip darf während und nach dem Färben nicht geschüttelt werden!**

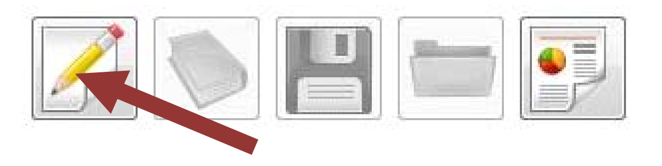
- Den Washing Buffer aus Schritt F) vollständig entfernen.
- **100 µL** Substrate in den MutaCHIP geben und für **5 min** bei **21 °C** inkubieren. Dazu den MutaCHIP in den Thermoshaker überführen **(keine Schüttelfunktion aktivieren)**
- Danach das Substrate wieder vollständig entfernen (Pipette) und umgehend **500 µl** Washing Buffer hinzugeben

MutaCHIP in den Imagereader überführen (auf korrekte Platzierung achten), Bild erstellen und mit der Analyse/ Auswertung beginnen (siehe folgendes Kapitel)

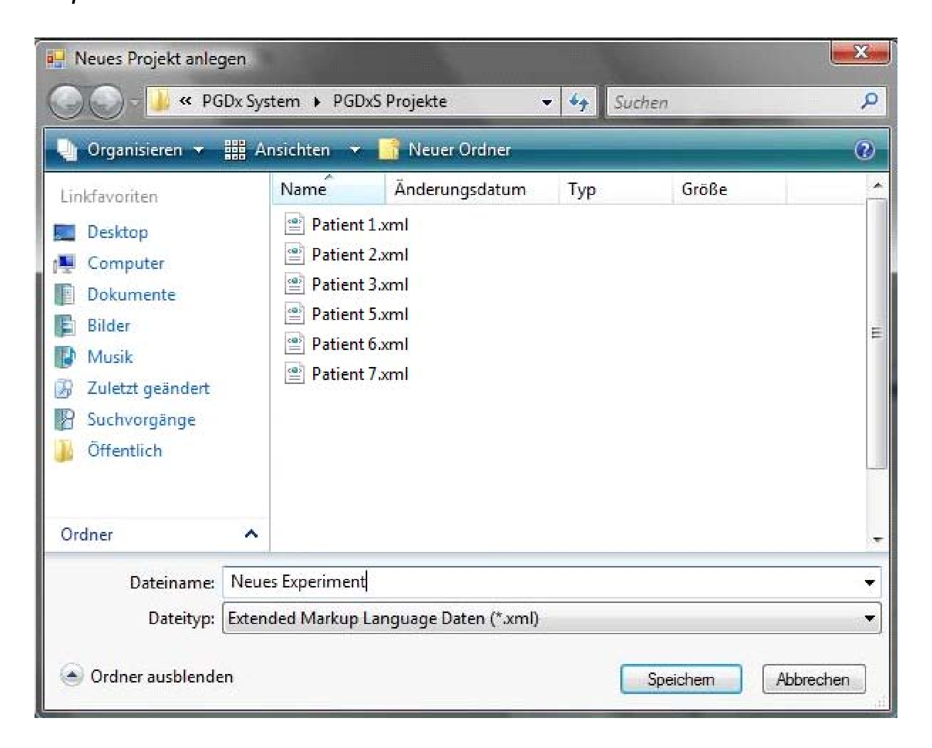
10 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über das MAAT und die TOXO Genomics Software. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Software in einem Report zusammengestellt. Für die Auswertung des Chips folgen Sie der folgenden kurzen Anleitung. Für weitere und detailliertere Informationen sehen Sie bitte im ARTERO Genomics Software Handbuch nach.

Schritt 1: Ein neues Projekt erstellen



Klicken Sie auf die Schaltfläche *Neues Experiment.* Vergeben Sie einen beliebigen Namen für das Experiment und speichern Sie es anschließend, indem Sie auf die Schaltfläche *Speichern* klicken.

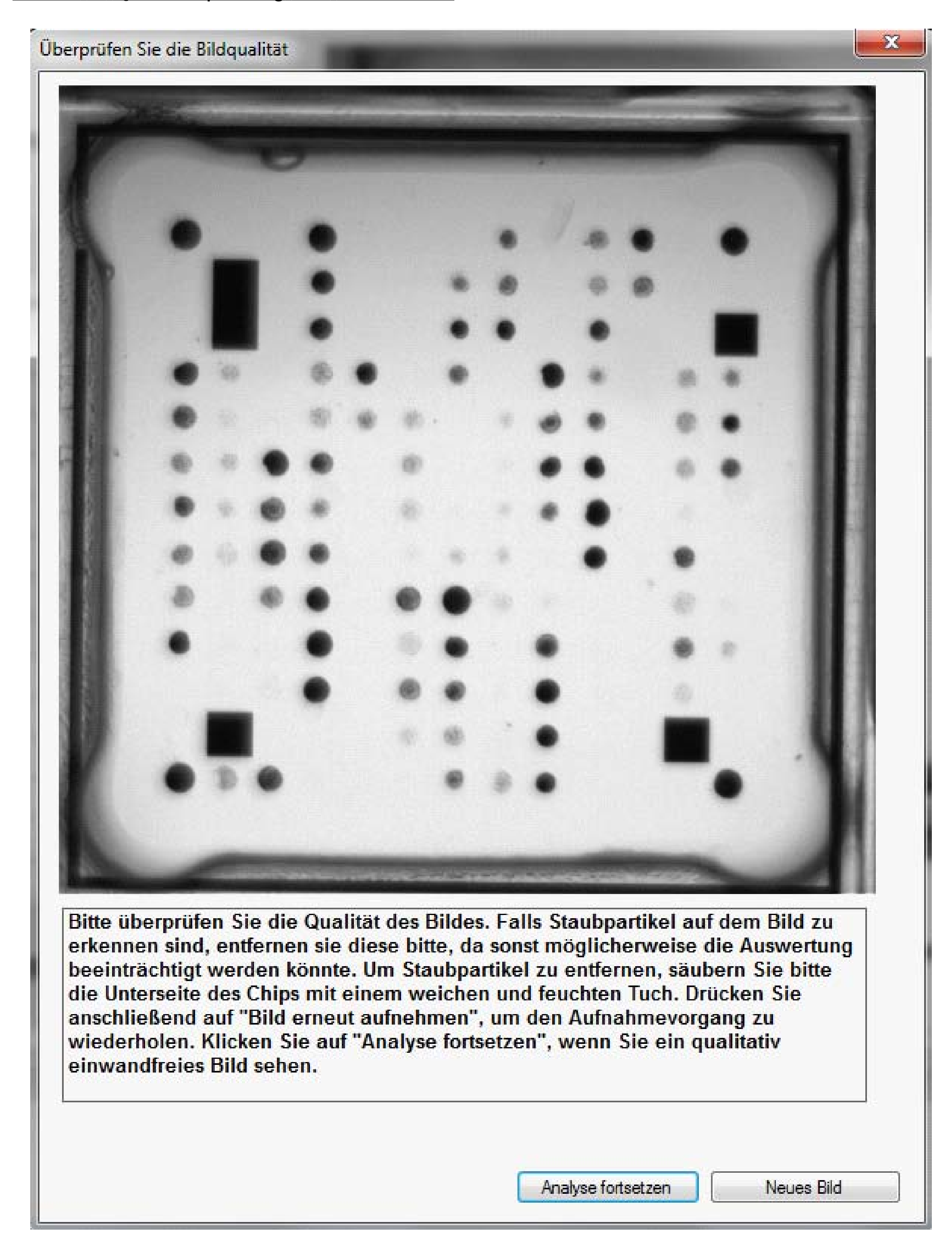


Schritt 2: Analyseprozess starten



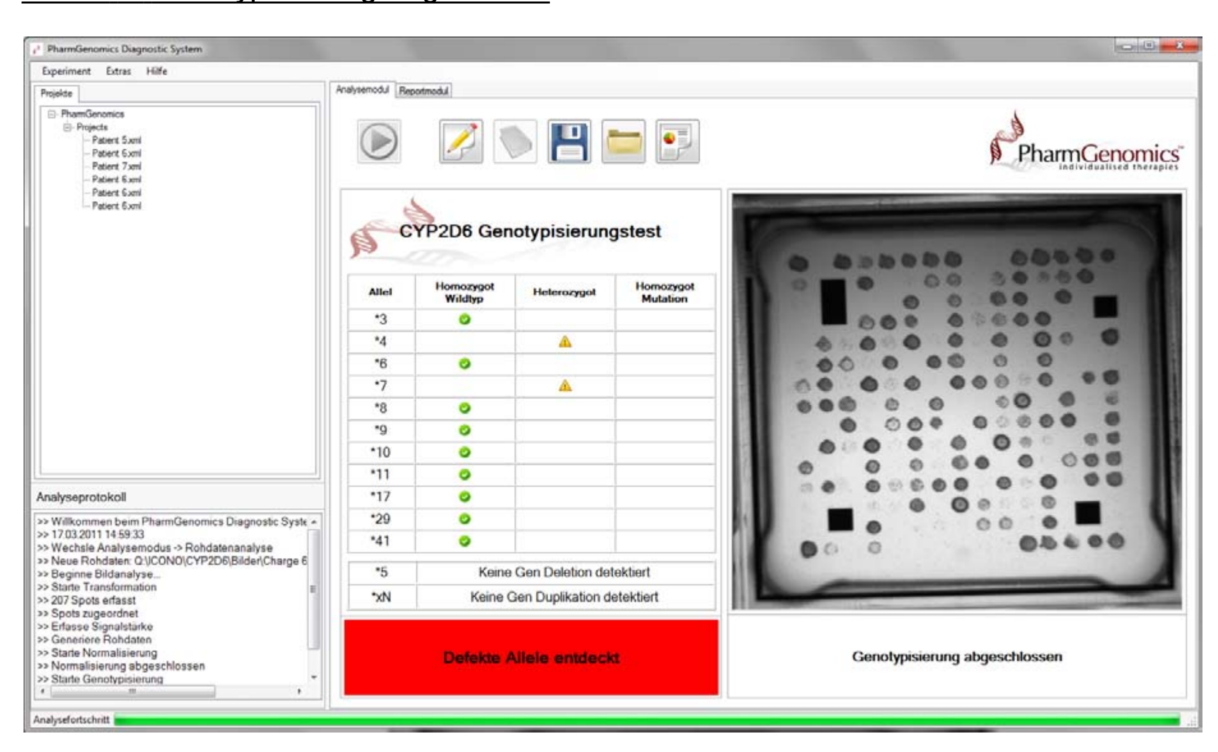
Klicken Sie auf die Schaltfläche *Start*, um die Datenanalyse zu starten.

Schritt 3: Qualitätsprüfung des MutaCHIPs



Um ein einwandfreies Analyseergebnis zu erhalten, muss zunächst die Bildqualität des MutaCHIPs überprüft werden. Staubpartikel auf der Unterseite des MutaCHIPs können die Analyse beinträchtigen. Diese können durch das säubern mit einem weichen und feuchten Tuch entfernt werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche Analyse fortsetzen, falls die Bildqualität der in der oberen Abbildung entspricht.

Schritt 4: Genotypisierungsergebnisse

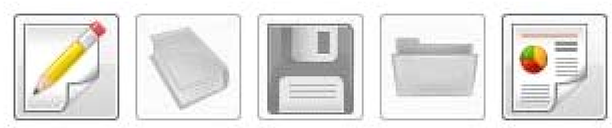


Nach der vollständigen Datenanalyse können Sie die Ergebnisse im Analysemodul / Genotypisierungsmodul oder im Diagnosebericht abrufen. Die dabei verwendete Symbole werden in der unten stehenden Tabelle erläutert.

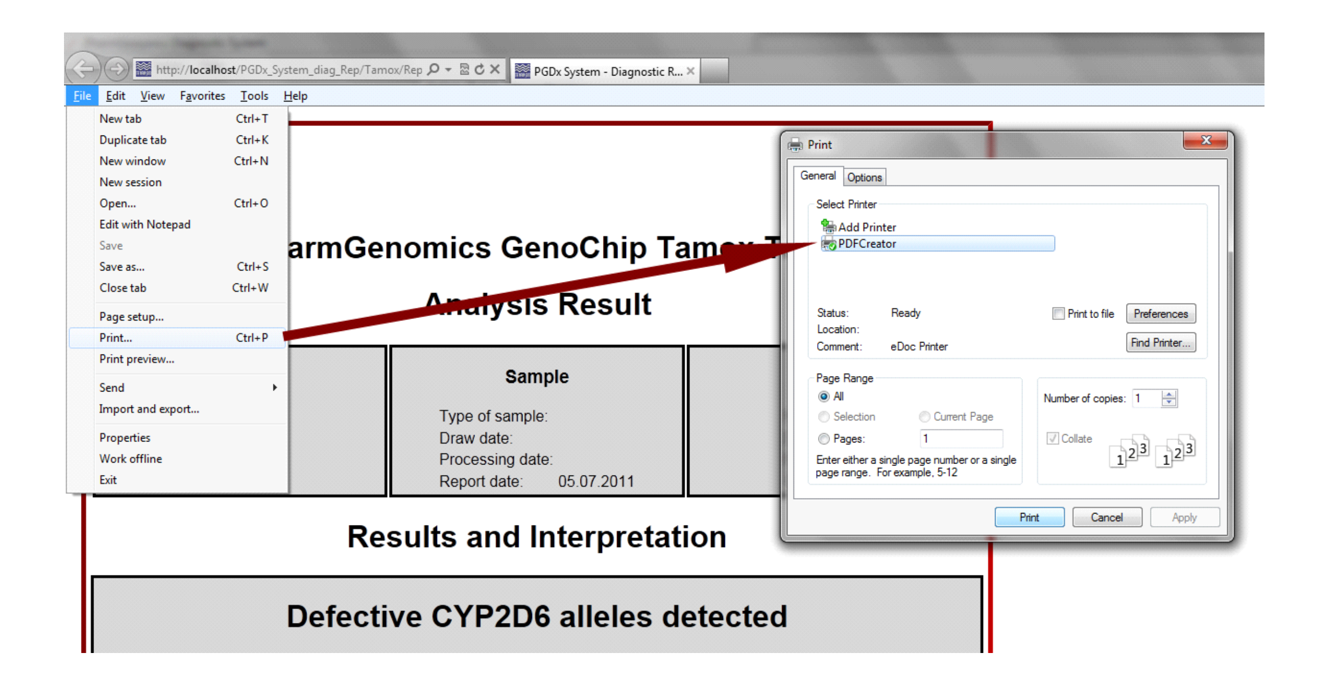
Symbole der Software und ihre Bedeutung

	Der Patient trägt auf beiden Allelen die gesunde Variante der untersuchten genetischen Variation.
	Der Patient trägt auf einem Allel die gesunde und auf dem anderen Allel die mutierte genetische Variation.
	Der Patient trägt auf beiden Allelen die mutierte genetische Variation in homozygoter Form.
	Die Signalwerte der Sonden für diese genetische Variation sind zu gering, um ein valides Ergebnis zu erzeugen. Dies könnte auf Sequenzveränderungen in direkter Nähe zur untersuchten Variation hindeuten. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.
	Beide Sonden für diese genetische Variation erzeugen ein nicht gültiges Signal. Dies könnte auf eine Verschmutzung auf der Chipoberfläche zurückzuführen sein. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.

Schritt 5: Diagnostischer Report



Um die Daten auszuwerten, lassen Sie sich den diagnostischen Report anzeigen. Klicken Sie hierfür auf die Schaltfläche *Report*.
Zusätzlich können Sie auch ein .pdf Dokument erstellen oder den Report direkt ausdrucken.



11 Troubleshooting

Problem	Lösung
Software Meldung: Warnung! Die Signale des Biotinreferenzmarkers sind zu niedrig. Dies kann ein Zeichen für einen fehlgeschlagenen oder nicht ausgeführten Konjugationsschritt sein oder das Enzym ist nicht mehr funktional. Das System muss gestoppt werden.	Prüfen Sie das Enzym und/oder Substrat. Wiederholen Sie den Assay mit neuem Enzym/Substrat.
Software Meldung: keine Fehlerangabe ErrorCode - 3011	Der Reader ist nicht richtig angeschlossen. Halten Sie „Esc“ für 3 Sekunden gedrückt und schließen Sie den Reader in der richtigen Art und Weise an - bitte wenden Sie sich an das Benutzerhandbuch des PGDx-Systems.
Schlechte Bildqualität	Reinigen Sie die Bodenunterseite des Arraygefäßes. Benutzen Sie ein weichesTuch, das mit Desinfektionsmittel angefeuchtet ist. Wiederholen Sie das Foto (es kann notwendig sein diesen Schritt mehrfach zu wiederholen).
Unscharfes Bild	Reinigen Sie vorsichtig die Kamera mit einem Tuch oder einem Wattstäbchen.





MutaCHIP® TOXO

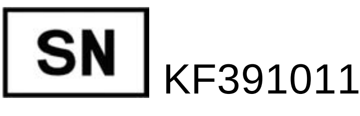
DNA-Macroarray Test Kit for the Analysis of Genetic Variations Associated with Detoxification



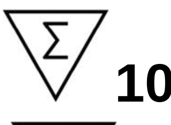


For in vitro diagnostics only





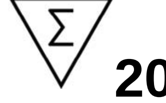
KF391011



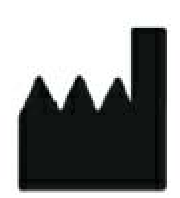
10



KF390011



20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com
Fax: +49 (0)6251/ 849430

Content

1 Application

The MutaCHIP® TOXO kit is a biomolecular test for the detection of mutations in genes responsible for the detoxification of the body. The genetic variations examined are associated with the biotransformation of xenobiotics and the antioxidative system.
Genomic DNA is used for the analysis by means of a DNA macroarray. The following single nucleotide polymorphisms (SNP) and mutations are analysed by the MutaCHIP® TOXO:

Character	Gene	Variation	rs number
Phase I Biotransformation	CYP1A1	*2A (3798T>C)	rs4646903
	CYP1A2	*1C (-3860G>A)	rs2069514
		*1F (-163A>C)	rs762551
	CYP2C9	*2 (430C>T)	rs1799853
		*3 (1075A>C)	rs1057910
	CYP2C19	*2 (19154G>A)	rs4244285
		*3 (17948G>A)	rs4986893
		*17 (-806C>T)	rs12248560
	CYP3A5	*2 (27289C>A)	rs28365083
		*3 (6986G>A)	rs776746
Phase II Biotransformation	GSTM1	14kb Deletion	
	GSTT1	50kb Deletion	
	GSTP1	A>G (Ile105Val)	rs1695
	NAT2	481C>T	rs1799929
		590G>A	rs1799930
		857G>A	rs1799931
	COMT	G>A	rs4680
Phase III Biotransformation	MDR1	3435C>T	rs1045642
Antioxidative System	SOD2	C>T	rs4880
	CAT	-262C>T	rs1001179
	CYBA	242C>T	rs4673
	NOS3	-786C>T	rs2070744
Efficacy and Side-Effects of Warfarin	VKORC1	*2 (-1639G>A)	rs9923231

2 Introduction

The human body is continuously confronted with foreign and to some extent toxic substances. These xenobiotics include drugs, stimulants and chemicals. A great many of these foreign substances cannot be readily excreted as they are lipophilic, i.e. poorly or not at all water-soluble. Biotransformation prevents accumulation of xenobiotics by transforming lipophilic compounds into more hydrophilic ones that can be excreted from the body. Additionally biotransformational processes are involved in converting pro-drugs (inactive medication precursors) into their active forms.
There are three phases of biotransformation. During phase I functional groups are attached, either via oxidation, reduction or hydrolysis. Whilst phase II the intermediate products from phase I are coupled to endogenous, mostly highly hydrophilic functional groups (conjugation reaction). The last phase, phase III, encompasses export of now water-soluble substances from the cells. If this process is hampered by enzymatic deficiencies, e.g. caused by polymorphisms and other genetic variations, severe complications can develop. Foreign substances accumulate in the body potentially leading to serious side-effects or diseases, as for example cancer. Consequently, also pro-drugs are not activated and are not fully functional and efficient.
Reactive oxygen species (ROS) are damaging to all kinds of biomolecules. During biotransformation, as well as by drugs and environmental toxins, ROS can be produced inside the body. The antioxidative system is engineered to eliminate ROS and protect cells before they are damaged. Among others, cancer and neurodegenerative diseases can be the consequence of impaired ROS clearing, e.g. by dysfunctional enzymes.
A number of polymorphisms and gene variations with relation to detoxification have been identified so far (see section 1). Genotyping detects these mutations and identifies such persons who are at a higher risk for developing the above mentioned conditions.

References:

- Coleman M. D. Human Drug Metabolism: An Introduction. 2. Edition, 2010. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Ernst B., Vögtli A. Moderne Pharmakokinetik: Transport durch Membranen. 1. Edition, 2010. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Karlson P., Doenecke D., Koolman J., Fuchs G., Gerok W. Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 5. Edition, 2005. Stuttgart, Germany: Thieme Verlagsgruppe.

3 Concept of the Assay

To analyse the mutations a PCR is performed, which amplifies the relevant genes using freshly extracted genomic DNA as template. The amplification product is transferred to the MutaCHIP, where it binds to the immobilized probes. During the washing step not perfectly bound fragments are removed. Subsequently, the enzyme is added, which binds to the remaining probe-fragment complexes. After adding the substrate the precipitation reaction occurs only at those spots at which DNA is still attached. The colored precipitation pattern is then detected by the image reader and analyzed as well as interpreted by the associated software. The analysis via precipitation reaction allows a distinct genotyping of all alleles spotted on the MutaCHIP.

4 Components

Each test kit contains the following components for 10 / 20 MutaCHIP assays and the instruction manual:

Description	Size of Reaction Tube or Flask	Number
PCR Mix A	2 mL Reaction Tube **(green lid)**	1
PCR Mix B	2 mL Reaction Tube **(yellow lid)**	1
PCR Mix C	2 mL Reaction Tube **(red lid)**	1
PCR Mix D	2 mL Reaction Tube **(blue lid)**	1
PCR Mix E	2 mL Reaction Tube **(white lid)**	1
Polymerase	2 mL Reaction Tube **(purple lid)**	1
Hybridisation Buffer	15 mL / 30 mL Plastic Flask	1
Washing Buffer	30 mL / 60 mL Plastic Flask	1
Conjugation Mix	2 mL Reaction Tube **(black lid)**	1 / 2
Substrate	2 mL Reaction Tube **(brown, blue lid)**	1 / 2
DNA Ref	2 mL Reaction Tube **(orange lid)**	1
MutaCHIPs	1.5 mL Reaction Tube	10 / 20
Instruction manual	/	1

5 Materials

Required materials that can be ordered separately from PharmGenomics:

- Macroarray Analysing Tools (MAAT):
  - Notebook + TOXO Genotyping Software
  - MutaCHIP image reader
  - Thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced)
  - Thermoshaker with cooling function(BIOR Mixing Block MB-102)

Required Materials – not provided

- pipettes:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 0.5 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0.2 mL PCR tubes (sterile)

6 Storage and Shelf life

- The Polymerase has to be stored at -20 °C
- All other components are stored at 2-8 °C.
- The substrate has to be strictly protected against light exposure.
- The bags contain each 5x MutaCHIPs with open lids. After unsealing a bag, the lids of the remaining MutaCHIPs have to remain open as the protection gas escapes.
- The MutaCHIPs can be stored in the loosely (not airtight) closed (do not use tape) light-protection bag up to several weeks and room temperature (RT). For storage choose a dry and dark place.
- To avoid even minimal loss of performance, we recommend using up one bag of MutaCHIPs within two weeks.
- The MutaCHIPs have to be protected against direct exposure to sunlight and dust. and dust.

7 Working Conditions

- Never centrifuge the MutaCHIPs.
- Do not touch the surface of the MutaCHIPs with a pipette.
- Use only substances that are mentioned in the protocol.

8 Considerations and Precautions

The guidelines and principles for working in a biomolecular laboratory have to be followed.

- The test is suitable for genomic DNA **freshly** extracted from whole EDTA blood as starting material. Only then optimal results are guaranteed.
- Do not mix reagents from different lots.
- The MutaCHIPs are:
  - for single-use only
  - only for *in vitro* diagnostics
- Do not let the MutaCHIP dry out while performing the analysis!
- The MutaCHIP is designed for the use with the MAAT and the software provided by PharmGenomics.
- Perform all steps in a timely manner.
- Keep all stock solutions cooled while working.
- Always open the MutaCHIP with both hands. Do not apply pressure to the tube.

9 Sample Collection

The template for PCR amplification is genomic DNA from EDTA whole blood. The DNA concentration should be between 15 and 30 ng/µL. The minimum DNA purity (A260/A280 ratio) should be higher than OD 260/280 1.8.
For the assay high molecular (freshly extracted) DNA has to be used.

10 Test Procedure

10.1 PCR Product Generation

- Before starting, make sure that all working surfaces and utilized devices are decontaminated.
- Prepare all components of the kit required for the procedure of the PCR
- Subsequently, perform the PCR according to the protocol listed below.
- For the amplification of target DNA, five PCR reactions per sample are required - one for each mastermix! Those are pipetted as described in the following tables.

PCR Mix A:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 60 ng - max. 120 ng)	4.0 µL
PCR Mix A **(green lid)**	20.8 µL
Polymerase	0.2 µL

PCR Mix B:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 60 ng - max. 120 ng)	4.0 µL
PCR Mix B **(yellow lid)**	20.8 µL
Polymerase	0.2 µL

PCR Mix C:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 60 ng - max. 120 ng)	4.0 µL
PCR Mix C **(red lid)**	20.8 µL
Polymerase	0.2 µL

PCR Mix D:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 60 ng - max. 120 ng)	4.0 µL
PCR Mix C **(blue lid)**	20.8 µL
Polymerase	0.2 µL

PCR Mix E:

Component	Volume per 25 µL- reaction mixture
DNA (min. 60 ng - max. 120 ng)	4.0 µL
PCR Mix C **(white lid)**	20.8 µL
Polymerase	0.2 µL

Place the samples in the Thermocycler and continue with chapter 10.2.

10.2 PCR Protocol

The PCR protocol has to be established anew for each laboratory, as different thermocyclers have different heating rates. This establishment can be omitted when using the recommended thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced). The following standard protocol can be used to start the establishing process:

	Temperature [°C]	Time [min]	
Start	94	2	1x
Denaturation	94	0.5	10 x
Primer Hybridisation	72	0.5	
Elongation	72	1.5	
Denaturation	94	0.5	25 x
Primer Hybridisation	60	0.5	
Elongation	72	1.5	
Final Elongation	72	5	1x
Store at	8	Forever	-

10.3 MutaCHIP Protocol

A) Preparation of the Hybridisation Buffer

If the Hybridisation Buffer is turbid or a precipitate can be seen, it has to be heated in a microwave for several seconds (240 W) or in a water bath. Gently shake the Hybridisation Buffer until it gets clear, to homogenise it again. Before usage, it has to be cooled to room temperature (RT).

B) Preparation of DNA samples

- Preheat the thermoshaker to **51 °C**
- Add **5 µL** PCR product A, **5 µL** PCR product B, **5 µL** PCR product C, **5 µL** PCR product D und **5 µL** PCR product E in a separate tube and mix by brief vortexing
- Denature the mixture for **2 min** at **95 °C** in a thermocycler
- After denaturation, add **100 µL** Hybridisation Buffer
- Pipette the denatured mixture into the MutaCHIP without touching the bottom of the tube

C) Hybridisation

- Perform the hybridisation at **51 °C**, **550rpm** for **30 min.**

D) Washing steps after Hybridisation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Hybridisation Buffer from step C)
- Add carefully **500 µL** of Washing Buffer onto the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **51 °C** for **5 min**

E) Conjugation step

Set the thermoshaker to **21 °C**.

Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker! The Washing Buffer has to remain on the MutaCHIP until the target temperature is reached!

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Washing Buffer from step D)
- Add **100 µL** of Conjugation Mix to the MutaCHIP
- Incubate the MutaCHIP at **550 rpm** and **21 °C** for **15 min**

F) Washing step after conjugation step

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Conjugation Mix from step E)
- Add of **500 µL** Washing Buffer to the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **21 °C** for **5 min**

G) Precipitation

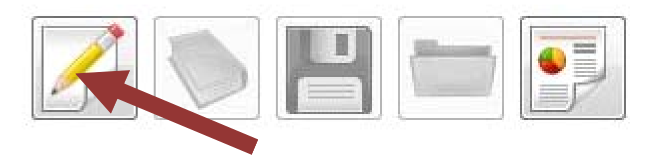
Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume! **Do not shake the MutaCHIP during the precipitation!**

- Completely remove the Washing Buffer from step F)
- Add **100 µL** of Substrate to the MutaCHIP and incubate for **5 min** at **21 °C.** To do so, put the MutaCHIP into the thermoshaker **(Do not activate shaking function)**
- Thereafter, remove the Substrate completely (pipette) and immediately add **500 µL** of Washing Buffer
- Place the MutaCHIP into the image reader (pay attention to the correct orientation), take a picture and start with the analysis/evaluation of the results (see following chapter)

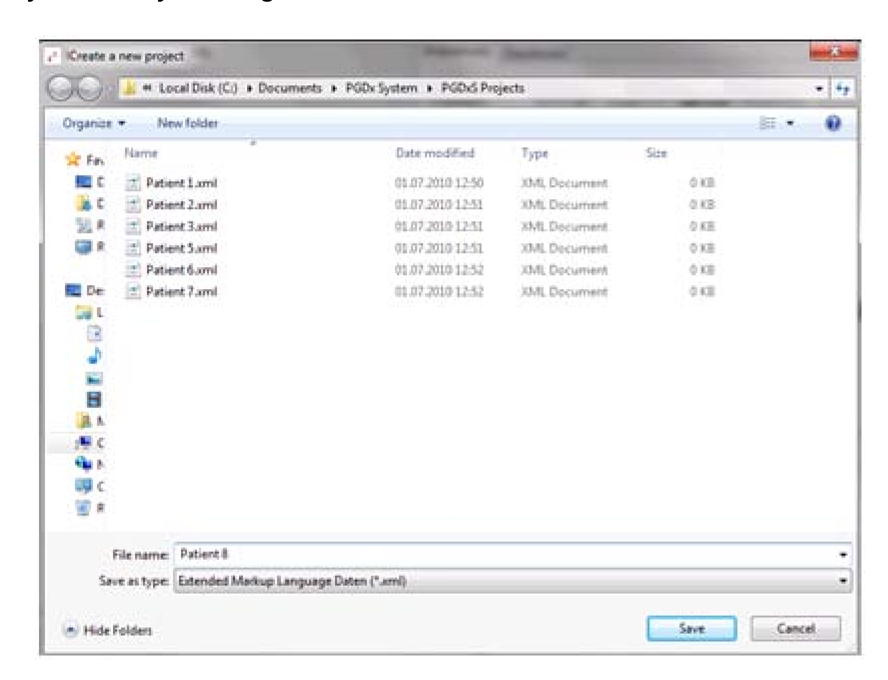
11 Evaluation and Interpretation of Results

The evaluation is performed using the MAAT and the TOXO Genotyping Software. The results are compiled with help of the software into a report. For the evaluation of the chip, follow the short instructions below. For further and detailed information, please refer to the TOXO Genotyping Software handbook.

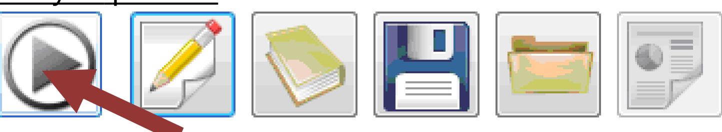
Step 1: Create a new project



Click on the button *New experiment*. Assign an arbitrary name for the experiment and subsequently save it by clicking on the button *save*.

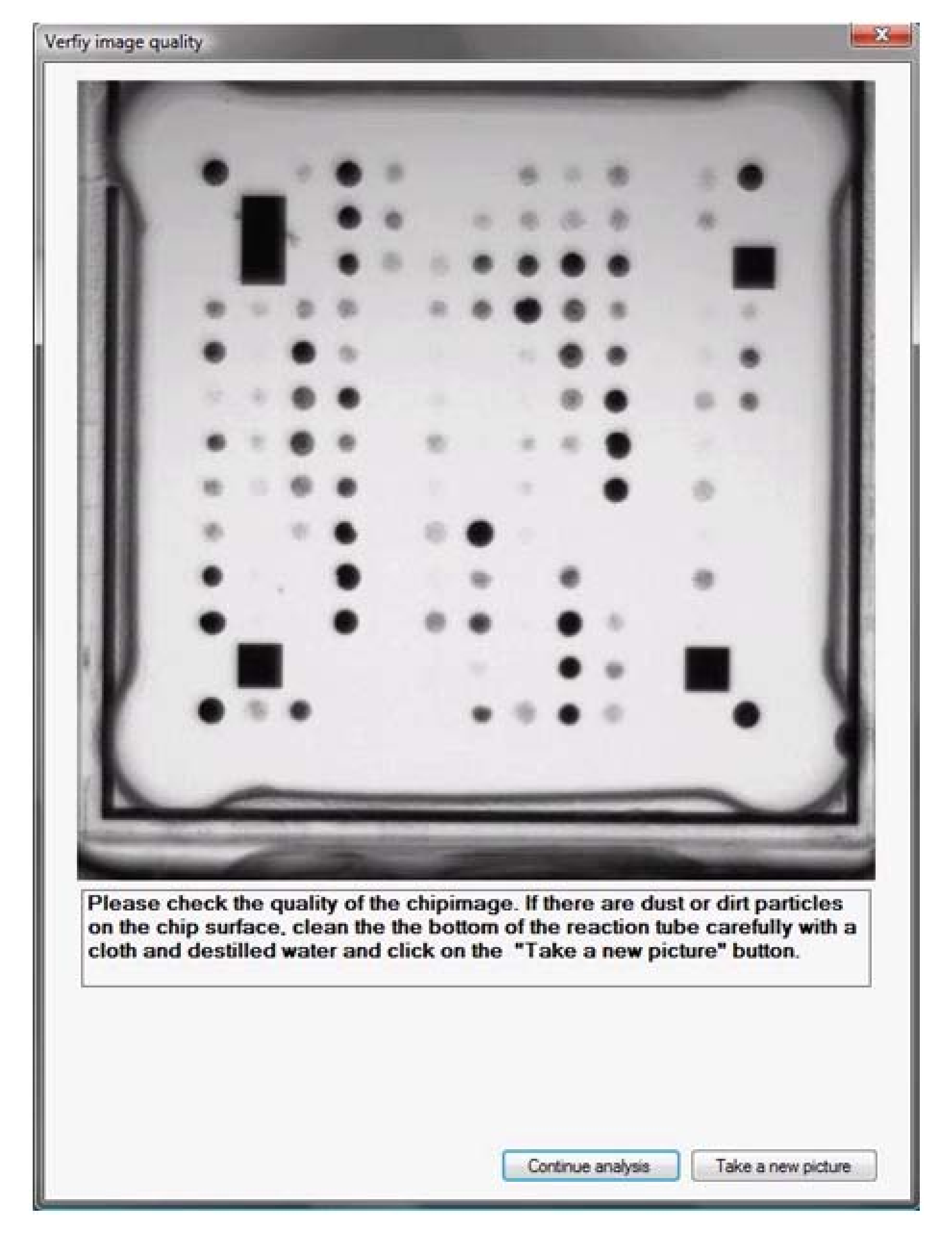


Step 2: Start the analysis process



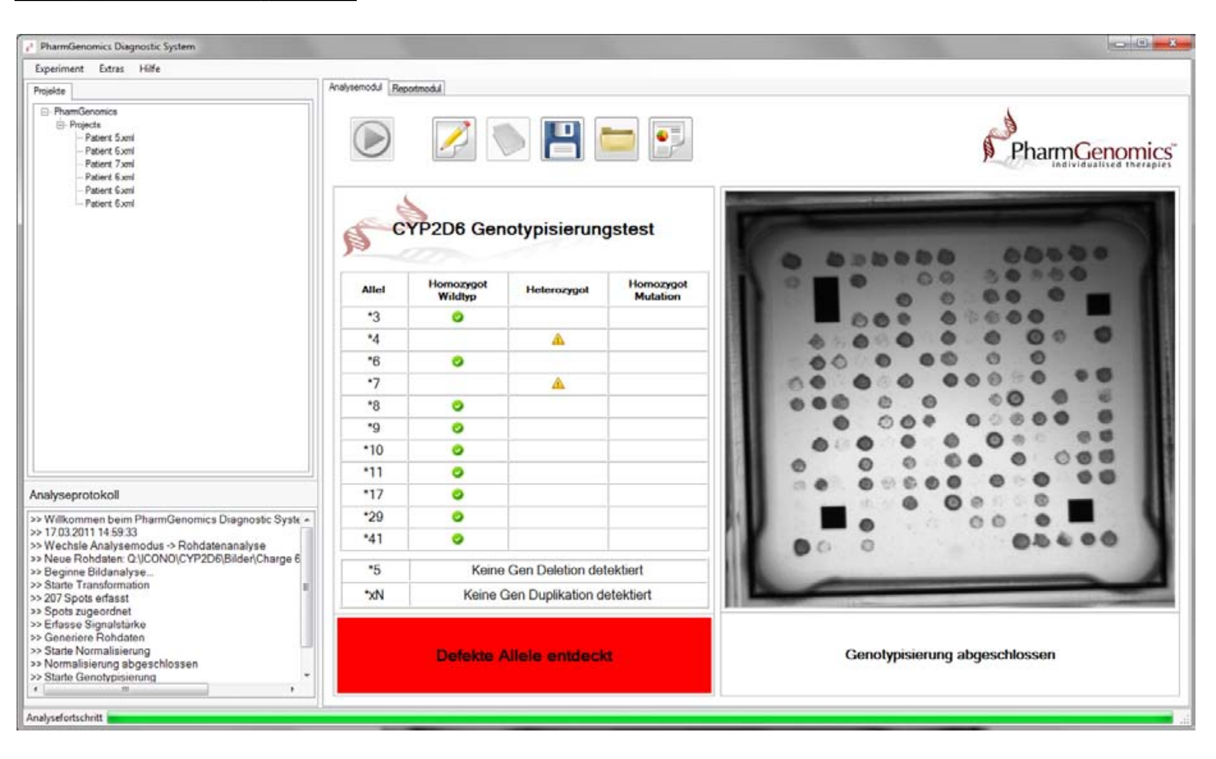
Click on the *Start* button to initiate data analysis.

Step 3: Quality check of the MutaCHIP



To ensure a correct analysis result, the picture quality of the MutaCHIP has to be checked. Particles of dust on the bottom side of the MutaCHIP can affect the analysis. These can be removed by cleaning with a soft and wet tissue. Follow the instructions given in the screen shown here. Press *Continue analysis* if the quality of the picture is comparable to the figure above.

Step 4: Genotyping results



After the complete data analysis, the results can be access in the analysis module / genotyping module or in the diagnostic report (example picture). The used icons are explained in the following table.

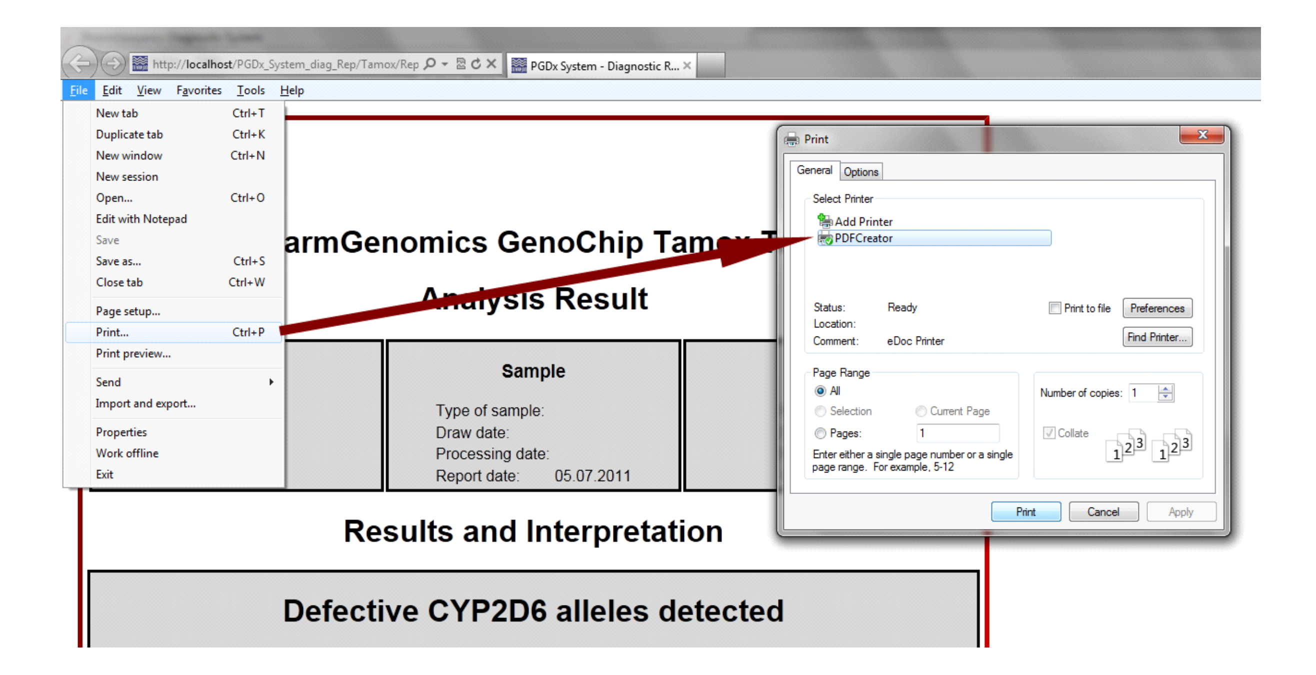
Symbole der Software und ihre Bedeutung

	The patient carries on both alleles the healthy variant of the investigated genetic variants.
	The patient carries on one allele the healthy and on the other allele the mutated genetic variant.
	The patient carries on both alleles the mutated genetic variation in homozygous form.
	The signal values of the probes for this genetic variation are too weak for a valid result. This could be caused by other sequence variations in close proximity to the investigated variant. The remaining signals of the assay are not influenced.
	Both probes for this genetic variant show an invalid signal. This might be caused by impurities or dust particles on the MutaCHIP surface. The remaining signals of the assay are not influenced

Step 5: Diagnostic report



To evaluate the results open the diagnostic Report Main. Therefore click on the button *Report*.
Additionally a .pdf document can be created or the report can be directly printed.



12 Trouble shooting

Problem	Solution
Software Message: Warning! The signals of the biotin reference markers are too low. This could be a sign of a failed or missed conjugation step. Alternatively the enzyme could be degraded. The system will be stopped.	Check enzyme and/or substrate. Repeat the assay with new enzyme/ substrate
Software Message: Warning! The signals of the DNA probes indicate a failed amplification.	Check the PCR products on a 2% agarose gel. If the gel is empty, please perform the amplification again and check on a gel before performing a chip.
No bands on agarose gel	Perform the DNA extraction again. If the problem persists, check the PCR protocol according to chapter 10.2 or contact PharmGenomics customer service.
Software Message: No error description ErrorCode -3011	The reader is not plugged in properly: Keep “Esc” pressed for 3 seconds and plug in the reader in the right manner – please refer to the user manual of the PGDx System
Poor image quality	Clean the bottom side of the MutaCHIP using a cotton swab or a cloth wet with disinfectant Repeat the photograph (it can be necessary to repeat this procedure several times)
Blurred picture	Carefully clean the camera with a cotton swab